

- [5] Wan C Y, Jiang W L, Zhi H Y, *et al.* Protective effect of baicalin on brain injury [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(2): 188-190.
- [6] Oddis C V, Finkel M S. Cytokine-stimulated nitric oxide production inhibits mitochondrial activity in cardiac myocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 213(3): 1002-1009.
- [7] Kudla G, Montessuit S, Eskes R, *et al.* The destabilization of lipid membranes induced by the C-terminal fragment of caspase 8-cleaved bid is inhibited by the N-terminal fragment [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(30): 22713-22718.
- [8] Bouaziz N, Redon M, Quere L, *et al.* Mitochondrial respiratory chain as a new target for anti-ischemic molecules [J]. *Eur J Pharmacol*, 2002, 441(1-2): 35-45.

银杏内酯 A 和 B 混合物对大鼠永久性局灶性脑缺血的保护作用

王 旋^{1,2}, 顾振纶¹, 秦振红¹, 张慧灵^{1*}

(1. 苏州大学医学院 药理教研室, 江苏 苏州 215007; 2. 上海市普陀区人民医院, 上海 200060)

摘要:目的 研究银杏内酯 A 和 B 混合物 (ginkgolide A and ginkgolide B, GKAB) 对大鼠永久性局灶性脑缺血的保护作用。方法 采用大鼠永久性大脑中动脉阻塞 (permanent middle cerebral artery occlusion, pMCAO) 模型观察 GKAB 12.5、25、50 mg/kg iv 给药对脑梗死体积、脑含水量、行为学症状及组织形态学 (光镜) 的影响。结果 GKAB 12.5、25、50 mg/kg iv 给药呈剂量依赖性减少 pMCAO 大鼠脑梗死体积、降低脑含水量、改善行为学症状及减轻脑组织形态改变。50、25 mg/kg 组与模型组相比均有显著性差异 ($P < 0.01, 0.05$)。结论 GKAB 对大鼠永久性局灶性脑缺血损伤具有保护作用。

关键词:银杏内酯 A; 银杏内酯 B; 脑缺血; 永久性大脑中动脉阻塞

中图分类号:R286.10

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)02-0241-04

Protective effect of mixture of ginkgolide A and ginkgolide B on permanent focal cerebral ischemia in rats

WANG Xuan^{1,2}, GU Zhen-lun¹, QIN Zhen-hong¹, ZHANG Hui-ling¹

(1. Department of Pharmacology, School of Medicine, Soochow University, Suzhou 215007, China;

2. Shanghai Puto District People's Hospital, Shanghai 200060, China)

Key words: ginkgolide A; ginkgolide B; cerebral ischemia; middle cerebral artery occlusion (MCAO)

缺血性脑中风 (包括脑梗死、脑血栓形成) 约占脑血管疾病的 80%, 是人类严重病残和死亡原因之一。脑缺血后病理生理改变有诸多因素参与, 如能量代谢耗竭、兴奋性氨基酸毒性、细胞内钙超载、毒性氧自由基产生、酸中毒、花生四烯酸产生等。这些不利因素是导致神经元损伤的主要原因。目前银杏叶提取物 (*Ginkgo biloba* extract, GBE) 是临床上防治缺血性脑损伤广泛应用的最有效药物之一。银杏中具有生理活性的主要化学成分为黄酮苷、萜内酯和聚萜烯醇等化合物。其中萜内酯类化合物有: 银杏内酯 A、B、C、M、J 及白果内酯。已证明银杏内酯均为强的血小板活化因子 (platelet activating factor, PAF) 拮抗剂, 且抑制 PAF 是本类药物抗缺血性脑损伤的基本作用机制之一。银杏内酯中抗

PAF 活性最强的是银杏内酯 B, 其次为银杏内酯 A, 且银杏内酯 A 和 B 均为银杏内酯中的主要成分。因此, 本课题组欲开发银杏内酯 A 和 B 的混合物 (GKAB) 的静脉注射剂。本实验观察 GKAB 对大鼠永久性局灶性脑缺血的保护作用, 以期对 GKAB 的临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物: SD 大鼠, 雄性, (300±10) g, 清洁级, 由苏州大学医学院实验动物中心提供, 生产许可证 XCYK (苏): No 2002-0008, 使用许可证 SYXK (苏): No 2002-0037。

1.2 药物、试剂与仪器: GKAB [银杏内酯 A-银杏内酯 B (1:1)], 中国科学院上海药物研究所提供, 用生理盐水溶解。红四氮唑 (TTC, 中国医药集团上

收稿日期: 2006-06-04

基金项目: 香港保健协会资助项目 (20030816 HK)

作者简介: 王 旋 (1977—), 女, 苏州人, 硕士研究生, 主要研究方向为神经药理学, 目前就职于上海市普陀区人民医院。

Tel: (0512) 66110866 E-mail: wx741109@sohu.com

* 通讯作者 张慧灵 Tel: (0512) 65190599

海化学试剂公司生产,批号为 F20021008),用蒸馏水配成 4% 溶液。尼莫地平注射液(天津金耀氨基酸有限公司,批号为 0302141)。自动控温加热垫(BME—421A,中国医学科学院生物医学工程所)。

1.3 方法

1.3.1 分组:选择健康雄性 SD 大鼠 114 只,体重(300±10)g,随机分成 6 组,每组 19 只,分别为假手术组,模型组,尼莫地平阳性对照药组(0.6 mg/kg),GKAB 大、中、小(50、25、12.5 mg/kg)治疗组。各组于造模手术 10 min 后,舌下 iv 给药。各组各选出 8 只大鼠进行行为学评分、TTC 染色;各组另取 8 只大鼠用于脑含水量测定,3 只用于 HE 染色。

1.3.2 大鼠永久性大脑中动脉阻塞(pMCAO)模型的建立:4% 水合氯醛(350 mg/kg, ip)麻醉后将大鼠背位固定,颈正中切口,分离右侧颈总动脉并穿 2 根缝线备用,再分离颈内、颈外动脉,并结扎颈外动脉。在已分离的颈总动脉近心端用缝线结扎,远心端用动脉夹阻断血流,在此之间,剪一小口,将一端加热成圆珠状(直径<0.3 mm)的尼龙线插入小口,去掉动脉夹,将尼龙线缓缓推入至大脑前动脉起始端(约 20 mm),通过阻断大脑中动脉的血供造成大脑中动脉缺血,缝合皮肤。假手术组只分离动脉但不插线。在整个麻醉期间,采用自动控温加热垫将大鼠肛温控制在(37±0.5)℃。

1.3.3 行为学症状评分:术后 24 h 进行行为学评分,方法如下:将动物置于地板上,若不停地向一侧转圈,计为 1 分。提鼠尾观察前肢屈曲情况,如双前肢对称伸向地面,记为 0 分,如手术对侧前肢出现腕屈曲、肘屈曲、肩内旋,分别计为 1、2、3 分。将动物置于平地上,分别推双肩向对侧移动,检查阻力,如双侧阻力对等且有力,计为 0 分;如向手术的对侧推动时阻力下降,根据下降程度不同分为轻度、中度、重度,分别计为 1、2、3 分。将动物双前肢置一金属网上,观察双前肢的肌张力,如双前肢肌张力对等且有力,计为 0 分;根据手术对侧肌张力下降程度不同计为 1、2、3 分。满分为 10 分,分值越高,则动物行为障碍越严重。

1.3.4 脑梗死体积测定:术后 24 h 将大鼠断头取脑,去掉嗅球、小脑和低位脑干,冠状切 4 刀分为 5 片,第 1 刀在脑前极与视交叉连线中点处,第 2 刀在视交叉部位,第 3 刀在漏斗柄处,第 4 刀在漏斗柄与叶尾极之间。脑片用 TTC 染色,染色液组成为:4% TTC 1.5 mL、1 mol/L KH₂PO₄ 0.1 mL、生理盐水

3.4 mL,37℃ 避光染色 30 min。正常组织呈红色,梗死组织为白色。4% 甲醛固定 2 d 后,用滤纸吸干液体再取出脑梗死组织,以梗死脑组织质量占大脑总质量的百分比作为脑梗死体积的指标,并算出保护率。

保护率=(模型组梗死体积-给药组梗死体积)/模型组梗死体积×100%

1.3.5 脑含水量测定:术后 24 h 将大鼠断头取脑,去掉嗅球、小脑和低位脑干,称取大脑湿质量,107℃ 烘烤 72 h 后称干质量。

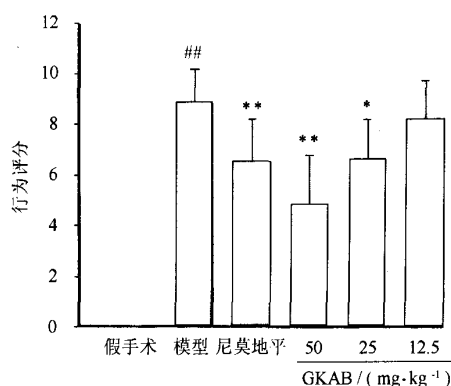
脑含水量=(湿质量-干质量)/湿质量×100%

1.3.6 脑组织形态学观察:术后 12 h 将动物断头取脑,按 3.4 所述方法将大脑从前向后切成 5 片,取第 2 片用 4% 甲醛固定,石蜡包埋,切成 4 μm 厚。进行 HE 染色,并于光镜下观察脑组织形态学的改变。

1.3.7 统计学分析:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 GKAB 对 pMCAO 大鼠行为症状的影响:模型组大鼠手术后 24 h 的神经症状评分为 8.81±1.36;GKAB 50、25、12.5 mg/kg 组大鼠的神经症状评分分别降低为 4.81±1.98、6.63±1.58、8.19±1.56;与模型组相比,GKAB 50、25 mg/kg 组大鼠术后 24 h 的神经症状评分差异显著(*P*<0.01、0.05)。结果提示 GKAB 可改善 pMCAO 大鼠的神经症状。结果见图 1。



与假手术组比较: ## *P*<0.01

与模型组比较: * *P*<0.05 ** *P*<0.01

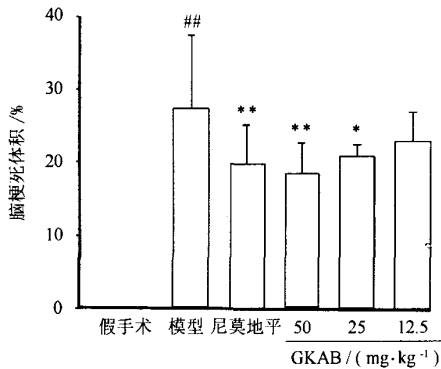
P<0.01 vs Sham group

* *P*<0.05 ** *P*<0.01 vs model group

图 1 GKAB 对 pMCAO 模型大鼠行为评分的影响 ($\bar{x} \pm s$, *n*=8)

Fig. 1 Effect of GKAB on neurologic symptom of pMCAO model rats ($\bar{x} \pm s$, *n*=8)

2.2 GKAB 对 pMCAO 大鼠脑梗死体积的影响: 模型组大鼠的脑梗死体积为 $(27.45 \pm 5.54)\%$; GKAB 50、25、12.5 mg/kg 组的脑梗死体积分别减少至 $(18.43 \pm 3.47)\%$ 、 $(20.95 \pm 3.62)\%$ 、 $(23.12 \pm 4.18)\%$; 各组的保护率分别为 32.87%、23.69%、15.77%。GKAB 50、25 mg/kg 组的脑梗死体积与模型组相比具有显著性差异 ($P < 0.01$ 、 0.05)。提示 GKAB 可减少大鼠脑梗死体积。结果见图 2。



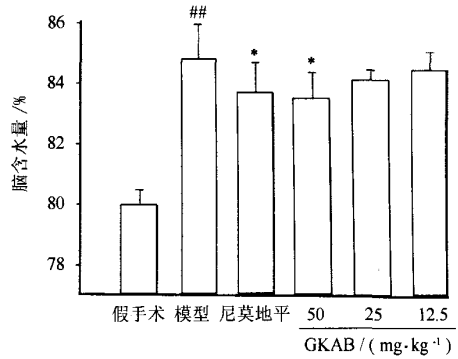
与假手术组比较: ## $P < 0.01$
与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
$P < 0.01$ vs Sham group
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

图 2 GKAB 对 pMCAO 大鼠脑梗死体积的影响
($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Fig. 2 Effect of GKAB on cerebral infarction volume on pMCAO of rats ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

2.3 GKAB 对 pMCAO 大鼠脑含水量的影响: 模型组大鼠的脑含水量 $[(84.79 \pm 1.20)\%]$ 显著高于假手术组 $[(79.97 \pm 0.52)\%]$ ($P < 0.01$)。GKAB

50、25、12.5 mg/kg 组大鼠脑含水量分别降低为 $(83.54 \pm 0.86)\%$ 、 $(84.15 \pm 0.36)\%$ 、 $(84.5 \pm 0.59)\%$, 与模型组相比, GKAB 大剂量组具有显著性差异 ($P < 0.05$)。结果见图 3。

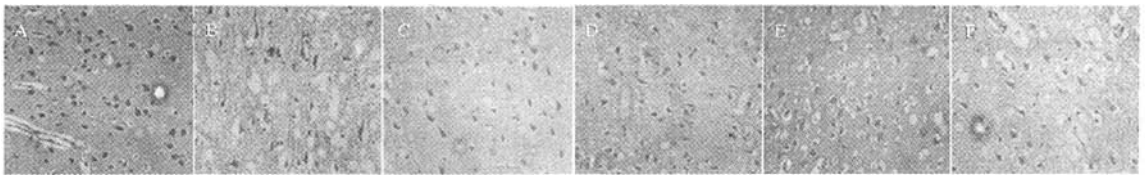


与假手术组比较: ## $P < 0.01$
与模型组比较: * $P < 0.05$
$P < 0.01$ vs Sham group
* $P < 0.05$ vs model group

图 3 GKAB 对 pMCAO 大鼠脑含水量的影响
($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Fig. 3 Effect of GKAB on brain water content in pMCAO of rat ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

2.4 GKAB 对 pMCAO 大鼠脑组织形态学的影响: HE 染色结果显示, 假手术组大鼠大脑皮层未见病理改变; 模型组大鼠大脑皮层梗死灶中心区大量神经细胞消失, 残存神经细胞核固缩, 神经纤维呈空泡状, 梗死灶周围大量细胞固缩、深染; GKAB 组大鼠大脑皮层梗死灶中心区神经细胞缺失明显少于模型组, 其周围结构完整的神经细胞数明显增多, 正常与坏死细胞相间存在。结果见图 4。



A-假手术组 B-模型组 C-尼莫地平组 D~F-GKAB 50、25、12.5 mg/kg 组
A-Sham group B-model group C-nimodipine group D~F-GKAB 50, 25, 12.5 mg/kg group

图 4 GKAB 对 pMCAO 大鼠脑组织形态学的影响

Fig. 4 Effect of GKAB on histomorphology of brain tissue in pMCAO of rats

3 讨论

大脑中动脉是人类脑卒中的多发部位, 大脑中动脉阻塞模型被普遍认为是局灶性脑缺血最好的动物模型, 与临床上病人脑半球局灶性梗死部位类似。人缺血性脑中风的多数病例是由永久性阻塞脑动脉所致, 因为中风患者早期阻塞的脑血管自发

性再通是很少见的, 因此实验性 pMCAO 模型可能与临床的实际情况更相近^[1]。本实验观察 GKAB 对大鼠永久性大脑中动脉阻塞的保护作用。结果证明: GKAB 25、50 mg/kg 术后 10 min 恒速 iv 给药 1 次, 可显著改善 pMCAO 大鼠行为障碍, 减小脑梗死范围, 减轻脑水肿和脑组织形态破坏, 说明

GKAB 对脑缺血具有保护作用。

GBE 具有广泛生物学效应,已证明银杏内酯制剂防治脑血管疾病主要与其抗 PAF、抑制血栓形成、清除自由基、抑制炎症反应、扩张脑血管、增加脑血流量等作用有关。但目前关于银杏内酯制剂抗缺血性脑损伤的分子机制的研究,鲜见文献报道。核因子- κ B (Nuclear factor- κ B, NF- κ B) 是介导炎症免疫、细胞增殖分化和诱导细胞凋亡等作用的关键性转录因子。近年来的研究表明,NF- κ B 也存在于神经元、胶质细胞和脑血管内皮细胞中,且 NF- κ B 在缺血性脑中风病理过程中起着重要的作用。尽管学者们对 NF- κ B 在神经元生存及死亡中发挥有益的作用(抑制凋亡),还是有害的作用(促进凋亡)存在争议,因刺激因素,细胞种类,激活的 NF- κ B 的亚单位和 NF- κ B 激活的时期而不同^[2~4]。但多数学者认为缺血性中风引起的 NF- κ B 在损伤区神经细胞内激活,进而促进神经细胞凋亡^[5~9]。NF- κ B p50 缺失的动物对缺血性中风有抵抗作用^[8,10],NF- κ B decoy 亦能减轻缺血性脑损伤^[11]。近期研究表明,NF- κ B 的超阻遏剂——丝氨酸-32 和丝氨酸-36 (IKK 磷酸化 I κ B α 的部位) 突变的 I κ B α 转基因小鼠减少永久性大脑中动脉阻塞所致的脑梗死体积和凋亡细胞^[12]。文献报道许多抗氧化剂通过抑制 NF- κ B 激活,在脑缺血时发挥神经保护作用^[9,13,14]。研究表明银杏内酯可以降低大鼠局灶性脑缺血模型脑组织乳酸(LA)、丙二醛(MDA)水平,降低脑脂质过氧化速率,同时升高超氧化物歧化酶(SOD),还原型谷胱甘肽(GSH)水平,加快脑组织超氧阴离子自由基的清除^[15,16]。因此推测银杏内酯抗缺血性脑损伤的作用可能与抑制脑缺血时 NF- κ B 的激活有关。抑制脑缺血时 NF- κ B 的激活是否是 GKAB 保护缺血性脑损伤的分子机制之一,有待进一步深入研究。

References:

- [1] Kassem-Moussa H, Graffagnino C. Nonocclusion and spontaneous recanalization rates in acute ischemic stroke: a review of cerebral angiography studies [J]. *Arch Neurol*, 2002, 59: 1870-1873.
- [2] Kaltschmidt B, Heinrich M, Kaltschmidt C. Stimulus-dependent activation of NF- κ B specifies apoptosis or

neuroprotection in cerebellar granule cells [J]. *Neuromolecular*, 2002, (2): 299-309.

- [3] Pizzi M, Goffi F, Boroni F, et al. Opposing roles for NF- κ B/Rel factors p65 and c-Rel in the modulation of neuronal survival elicited by glutamate and interleukin-1 beta [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 20717-20723.
- [4] Ryan K M, Ernst M K, Rice N R, et al. Role of NF- κ B in p53-mediated programmed cell death [J]. *Nature*, 2000, 404: 892-897.
- [5] Carrrol J E, Howard E F, Hess D C, et al. Nuclear factor- κ B activation during cerebral reperfusion: effect of attenuation with N-acetylcysteine treatment [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 1999, 56: 186-191.
- [6] Clement J A, Stephenson D T, Dixon E P, et al. Global cerebral ischemia activates nuclear factor- κ B prior to evidence of DNA fragmentation [J]. *Mol Brain Res*, 1997, 48: 187-196.
- [7] Clemens J A, Stephenson D T, Yin T, et al. Drug-induced neuroprotection from global ischemia is associated with prevention of persistent but not transient activation of nuclear factor- κ B in rats [J]. *Stroke*, 1998, 29: 677-682.
- [8] Schneider A, Martin-Villalba, Weih F, et al. NF- κ B is activated and promotes cell death in focal cerebral ischemia [J]. *Nature Med*, 1999, 5: 554-559.
- [9] Stephenson D, Yin T, Smalstig E B, et al. Transcription factor nuclear factor- κ B is activated in neurons after cerebral ischemia [J]. *J Cereb Blood flow Metab*, 2000, 20: 592-603.
- [10] Nurmi A, Vartiainen N, Koistinaho M, et al. Functional role of nuclear factor κ B in ischemic stroke [J]. *Stroke*, 2004, 35: 987-991.
- [11] Ueno T, Sawa Y, Kitagawa-Sakakida S, et al. Nuclear factor- κ B decoy attenuates neuronal damage after global brain ischemia: a future strategy for brain protection during circulatory arrest [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2001, 122: 720-727.
- [12] Zhang W, Potrovita I, Tarabin V, et al. Neuronal activation of NF- κ B contributes to cell death in cerebral ischemia [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, 25: 30-40.
- [13] Imai H, Graham D I, Masayasu H, et al. Anti-oxidant ebselen reduces oxidative damage in focal cerebral ischemia [J]. *Free Radic Biol Med*, 2003, 34: 56-63.
- [14] Pei Z, Pang S F, Cheung R T. Administration of melatonin after onset of ischemia reduces the volume of cerebral infarction in a rat middle cerebral artery occlusion stroke mode [J]. *Stroke*, 2003, 34: 770-775.
- [15] Wu X F, Wang Q J, Lou F C. Protective effect of ginkgolides on rat focal brain ischemia [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2001, 32(2): 141-145.
- [16] Wu X M, Chen H S, Jing S Y, et al. Effects of ginkgolides against injury of neurocytes induced by H₂O₂ and expression of ginkgolides immediate early genes [J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther* (中国临床药理学与治疗学), 2003, 34(4): 401.

八 荣 八 耻

树立社会主义荣辱观:以热爱祖国为荣、以危害祖国为耻,以服务人民为荣、以背离人民为耻,以崇尚科学为荣、以愚昧无知为耻,以辛勤劳动为荣、以好逸恶劳为耻,以团结互助为荣、以损人利己为耻,以诚实守信为荣、以见利忘义为耻,以遵纪守法为荣、以违法乱纪为耻,以艰苦奋斗为荣、以骄奢淫逸为耻。